



23374

① BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 101 26 940 A 1**

⑤ Int. Cl.⁷:
G 01 N 27/72
G 01 R 33/12

⑳ Aktenzeichen: 101 26 940.4
㉑ Anmeldetag: 1. 6. 2001
㉒ Offenlegungstag: 5. 12. 2002

DE 101 26 940 A 1

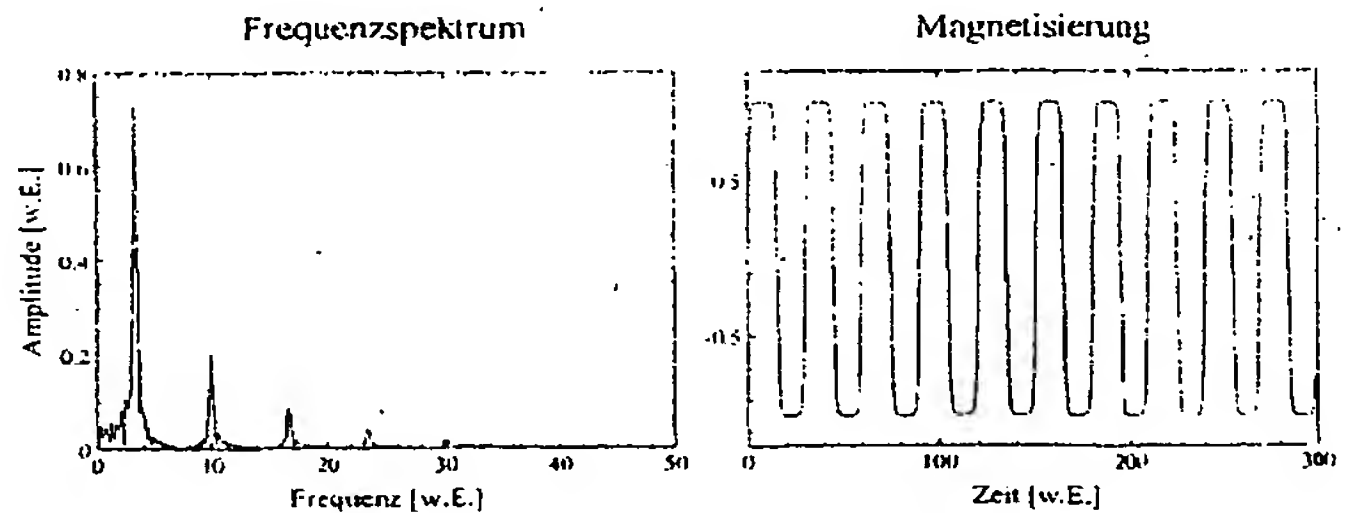
㉑ Anmelder:
Conradt, Robert, Dr., 78476 Allensbach, DE

㉒ Erfinder:
gleich Anmelder

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤④ Verfahren zur Detektion magnetischer oder magnetisierbarer Partikel

⑤⑦ Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zur Detektion magnetischer oder magnetisierbarer Partikel dar, welches in Kombination mit einer geeigneten Vorrichtung zur Magnetisierung der magnetischen Partikel verwendet werden kann. Durch die chemische/biologische Funktionalisierung magnetischer Partikel dienen diese als Anlagerungsziel für andere (Ziel-)Moleküle. Mit Hilfe der Vorrichtung erlaubt das Verfahren die Zählung des Zielmoleküls auf die Zählung der magnetischen Partikel zu reduzieren. Das Verfahren verwendet vor allem die Nichtlinearität der Magnetisierungskennlinie der magnetischen Partikel. Durch zeitlich variierende Anregung der magnetischen Partikel mit einem magnetischen Feld bis in den Sättigungsbereich erscheinen im Spektrum der zeitlich variierenden Magnetisierung Frequenzkomponenten höherer Ordnung, die zur Detektierung verwendet werden.



DE 101 26 940 A 1

BEST AVAILABLE COPY

Beschreibung

[0001] In Gebieten der Biologie, Physik oder Medizin besteht häufig die Aufgabe, Suspensionen, die eine oder mehrere Sorten suspendierter Partikeln enthalten, genau zu klassifizieren. Eine hinreichende Klassifizierung wird durch Angabe der Anzahl der Partikelarten und durch die Anzahl der Partikel der jeweiligen Partikelart erreicht. Partikel dieser Art werden verwendet, indem ein magnetisierbares Partikel mit Endgruppen derart funktionalisiert wird, so daß sich Moleküle anderer Art als Zielmolekül an dem funktionalisierten Partikel anlagern. Die Zählung der Zielmoleküle reduziert sich somit auf die Zählung der mit Endgruppen funktionalisierten magnetischen oder magnetisierbaren Partikel.

[0002] Es besteht also neben der Identifizierung verschiedener Partikelarten die Auszählung der identifizierten Partikelarten als Aufgabe. Die Erfassung der Konzentration ist ein erster Schritt zum Erlangen einer die Suspension bestimmenden Größe, die Ermittlung der absoluten Zahl der suspendierten Partikel, ggf. deren Verteilung, ist eine wesentlich genauere und damit auch informationsreichere Aussage.

[0003] Die quantitative Analyse der Suspension läßt sich durch mehrere Verfahren realisieren:

Stand der Technik

[0004] Lichtstreuung erlaubt die Bestimmung der Konzentration innerhalb eines Streuvolumens, dabei fällt als Resultat gleichzeitig eine Information über die Gestalt und die Geschwindigkeitsverteilung der Partikel an. Nachteilig ist ein vergleichsweise komplexer Aufbau und eine Reihe an Voraussetzungen, die für eine korrekte Analyse getroffen werden müssen.

[0005] Durch Leitfähigkeitsmessungen erhält man Aufschluß auf Beweglichkeit und Konzentration der Partikel. Die Methode ist vergleichsweise einfach, erfordert jedoch spezielle Meßzellen mit direkten Elektroden, so daß ein geschlossenes System in jedem Fall an einer Stelle für die Messung geöffnet werden muß.

[0006] Sehr genau und auch sehr partikelspezifisch arbeiten Methoden, bei denen ein beliebiger Sensor mit molekularen Endgruppen funktionalisiert ist und ein Reaktionszentrum für eine spezifische Partikelart darstellt. Durch Reaktion mit der (Ziel-)Partikelart ändert sich das Sensorsignal in der Regel sehr stark und es lassen sich sehr geringe Konzentrationen nachweisen. Nachteilig an dieser Methode stellt sich der Sensor dar, der nach der Messung in der Regel unbrauchbar wird, da die Reaktionszentren durch das Zielmolekül belegt sind.

[0007] Eine sehr elegante Möglichkeit stellen Suszeptibilitätsmessungen dar, bei denen entweder die elektrische Suszeptibilität (Polarisierbarkeit) oder die magnetische Suszeptibilität ermittelt wird. Dies geschieht durch Anlegen eines externen Feldes (elektrisches oder magnetisches) und Messen der Reaktion der Suspension.

Beschreibung der Erfindung

[0008] Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren zur quantitativen Erfassung magnetischer Partikel. Eine geeignete Vorrichtung findet sich beispielsweise in WO 00/49407 beschrieben. Hierbei wird, wie in Fig. 2 gezeigt, ein von einer Suspension durchflossenes Rohr ① in das Feld einer Spule ② gebracht.

[0009] Falls die Suspension magnetisierbar ist im Sinne von Paramagnetismus oder Ferromagnetismus, so ändert sich dadurch die Induktivität der gesamten Spulenordnung.

nung.

[0010] Zeigt die Suspension ein wie in Fig. 1 beschriebenes Verhalten, so läßt sich die Suspension durch geeignete Messung identifizieren. Die Magnetisierungskurve in Fig. 1 ist durch einen linearen Bereich bei kleinen Feldstärken ⑥ gekennzeichnet, der bei größeren Feldstärken in eine Sättigungsmagnetisierung ⑦ übergeht.

[0011] Das in dieser Erfindung vorgeschlagene Verfahren nutzt die Nichtlinearität der Magnetisierungskurve für die Detektion von magnetisierbaren (para- oder ferromagnetischen) Partikeln in einer Suspension aus. In Fig. 4 und Fig. 5 wird das Verfahren durch Messung der magnetischen Partikel mit zwei unterschiedlichen magnetischen Feldstärken verdeutlicht. In Fig. 4 ist die Antwort einer Suspension auf ein sinusförmig moduliertes magnetisches Feld kleiner Amplitude dargestellt. Die Amplitude des modulierten Magnetfeldes ist so klein gewählt, daß der in Fig. 1 mit ⑥ markierte lineare Bereich nicht verlassen ist. Somit ist auch die Magnetisierung als Funktion der Zeit in Fig. 4 sinusartig und das zugehörige Spektrum ⑧ zeigt nur eine Linie bei der Frequenz der sinusförmigen Anregung.

[0012] Wird im weiteren Verfahren die Amplitude der sinusförmigen Anregung durch ein Magnetfeld derart erhöht, so daß der nichtlineare Teil ⑦ der Magnetisierungskurve in Fig. 1 erreicht wird, so bedeutet dies, daß die magnetisierbaren Partikel eine Sättigungsmagnetisierung erreichen. Über der Zeit aufgetragen erhält man den in Fig. 5 (rechts) dargestellten Verlauf, der wegen Erreichen der Sättigung fast einer Rechteckmodulation entspricht. Im Spektrum des Magnetisierungssignales tauchen neben der Linie der Grundfrequenz ⑧ auch eine Linie ⑨ höherer Frequenz auf. Linien noch höherer Frequenz tauchen selbstverständlich gemäß der Nichtlinearität der Kurve Fig. 1 ebenfalls auf, jedoch mit geringerer Amplitude. Zur Detektion einer (magnetischen) Partikelsorte wird das Auftreten des Signales ⑨ verwendet. Dies hat neben anderen Verfahren den Vorteil, daß das Signal erst dann von Null verschieden wird, sobald sich zu untersuchende Substanz im Probenkopf im Bereich der Spule ② befindet.

[0013] Vorteilhaft für das verwendete Verfahren stellt sich der Umstand dar, daß nicht die Verschiebung der Frequenz der Magnetisierung durch die Änderung der Induktivität beim Durchfließen der Partikel analysiert wird, sondern das Auftreten einer Spektralkomponente (bei symmetrischer Magnetisierungskennlinie von mindestens dritter Ordnung), deren Amplitude direkt proportional der Menge an detektierten Partikeln ist. Dieser Umstand verbessert das Signal/Untergrund-Verhältnis außerordentlich.

[0014] Eine weitere Ausprägung des Verfahrens besteht in der Möglichkeit, auch die höheren Frequenzen neben ⑨ auszuwerten. Aus dem Verhältnis der Amplituden ⑩ dieser Linien und einer Eichmessung der Magnetisierungskurven der jeweils reinen Substanzen läßt sich eine Mischung und deren Mischungsverhältnis an magnetischen Partikeln in einer Suspension nachweisen.

Art der gewerblichen Anwendung

[0015] Durch die Funktionalisierung magnetischer oder magnetisierbarer Partikel bezüglich eines bestimmten weiteren Moleküls/Proteins wird das magnetische oder magnetisierbare Partikel spezifisches Reaktionszentrum ("Anziehungspunkt") für das vorgenannte Molekül/Protein. Durch geeignete Fraktionierung der Suspension werden Komplexe herausgefiltert, die aus den magnetischen Partikeln mit jeweils einem oder mehreren, je nach Funktionalisierung, angelagerten Zielmolekülen bestehen. Mit Hilfe einer Vorrichtung, die die Komplexe zeitlich variierend magnetisiert, und

einem Verfahren, welches die zeitlich variierende Magnetisierung analysiert, wird es möglich, die Menge der magnetisierbaren Partikel zu detektieren und damit, unter Kenntnis der Funktionalisierung des Partikels, auch die Menge des Zielmoleküls zu ermitteln. Zielmoleküle können z. B. Blutkörperchen, Bakterien, Farbstoffe, Botenstoffe, Viren etc. sein.

[0016] Als Vorteil des Verfahrens ist die Kombination mit bereits bekannten Vorrichtungen zur Magnetisierung und die daraus resultierende kostengünstige Anordnung eines Testsystems zu sehen.

[0017] Weiter ist von großem Vorteil die durch die Ausnutzung der Nichtlinearität der Magnetisierungskennlinie erzielbare hohe Auflösung bei der Ermittlung der Anzahl der detektierten magnetisierbaren Partikel zu werten.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Detektion magnetischer oder magnetisierbarer Partikel, **dadurch gekennzeichnet**, daß die zu detektierenden magnetisierbaren Partikel durch Anlegen eines sinusförmig modulierten magnetischen Feldes einer Amplitude, die ausreichend ist, die magnetisierbaren Partikel in die Sättigungsmagnetisierung zu überführen, eine zeitlich abhängige Magnetisierung aufweisen, deren spektrale Zerlegung in Frequenzen neben der Frequenz des anregenden Feldes weitere Frequenzen aufweist, die charakteristisch für die Magnetisierungskurve der magnetisierbaren Partikel sind und die zur Detektion der magnetisierbaren Partikel verwendet werden.

2. Verfahren zur Detektion magnetischer oder magnetisierbarer Partikel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß nur eine Frequenzkomponente des Spektrums der zeitlich variierenden Magnetisierung für die Erfassung der Menge der magnetisierbaren Partikel ausgewertet wird.

3. Verfahren zur Detektion magnetischer oder magnetisierbarer Partikel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß durch die Auswertung mehrerer Intensitäten von Frequenzkomponenten im Spektrum der zeitlich variierenden Magnetisierung sowohl die Menge als auch die Art des magnetischen oder magnetisierbaren Partikels identifiziert wird, vorausgesetzt die Magnetisierungskennlinie des magnetischen oder magnetisierbaren Partikels sei, beispielsweise durch Eichmessung, bekannt.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

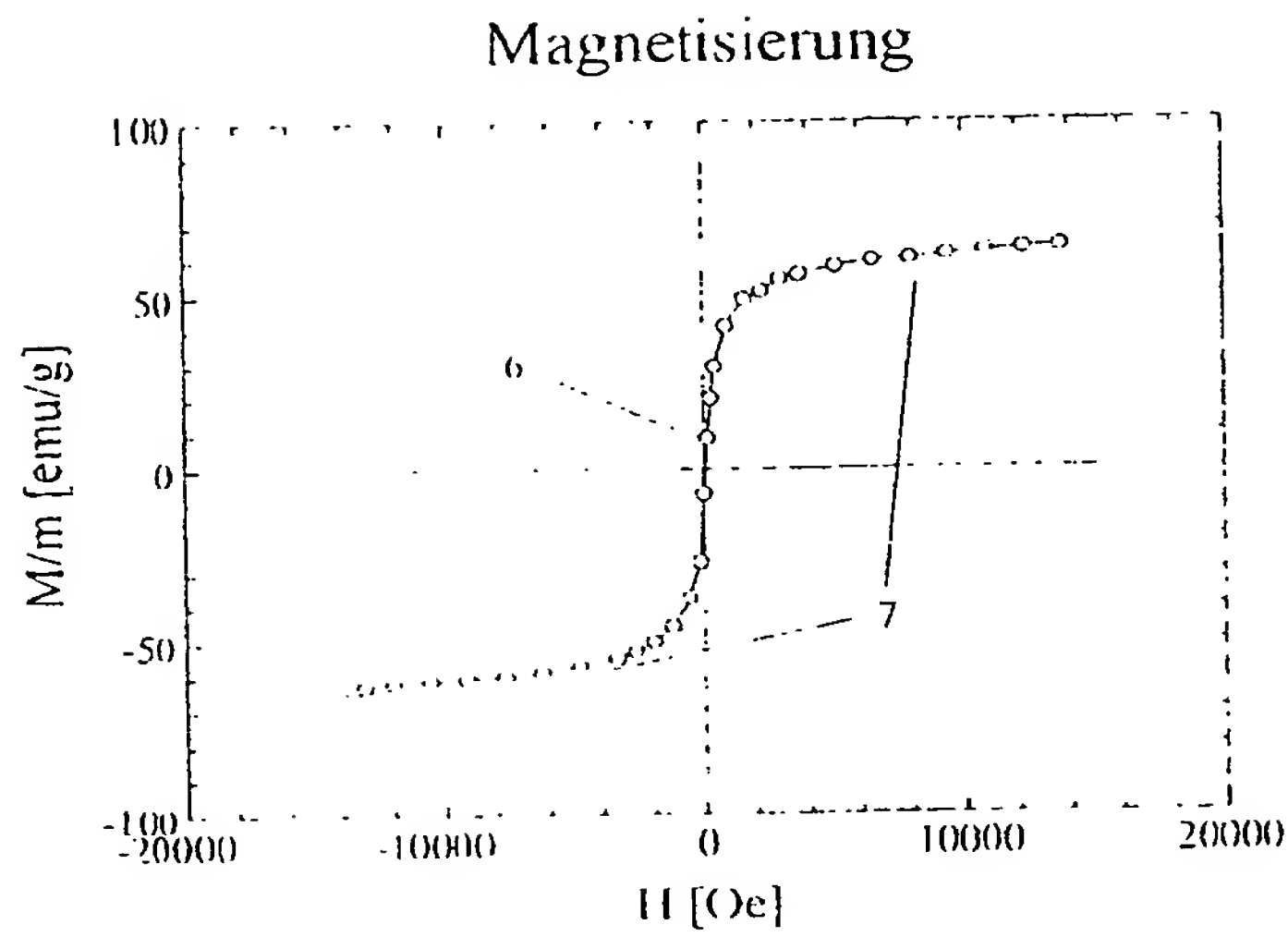


Fig. 1

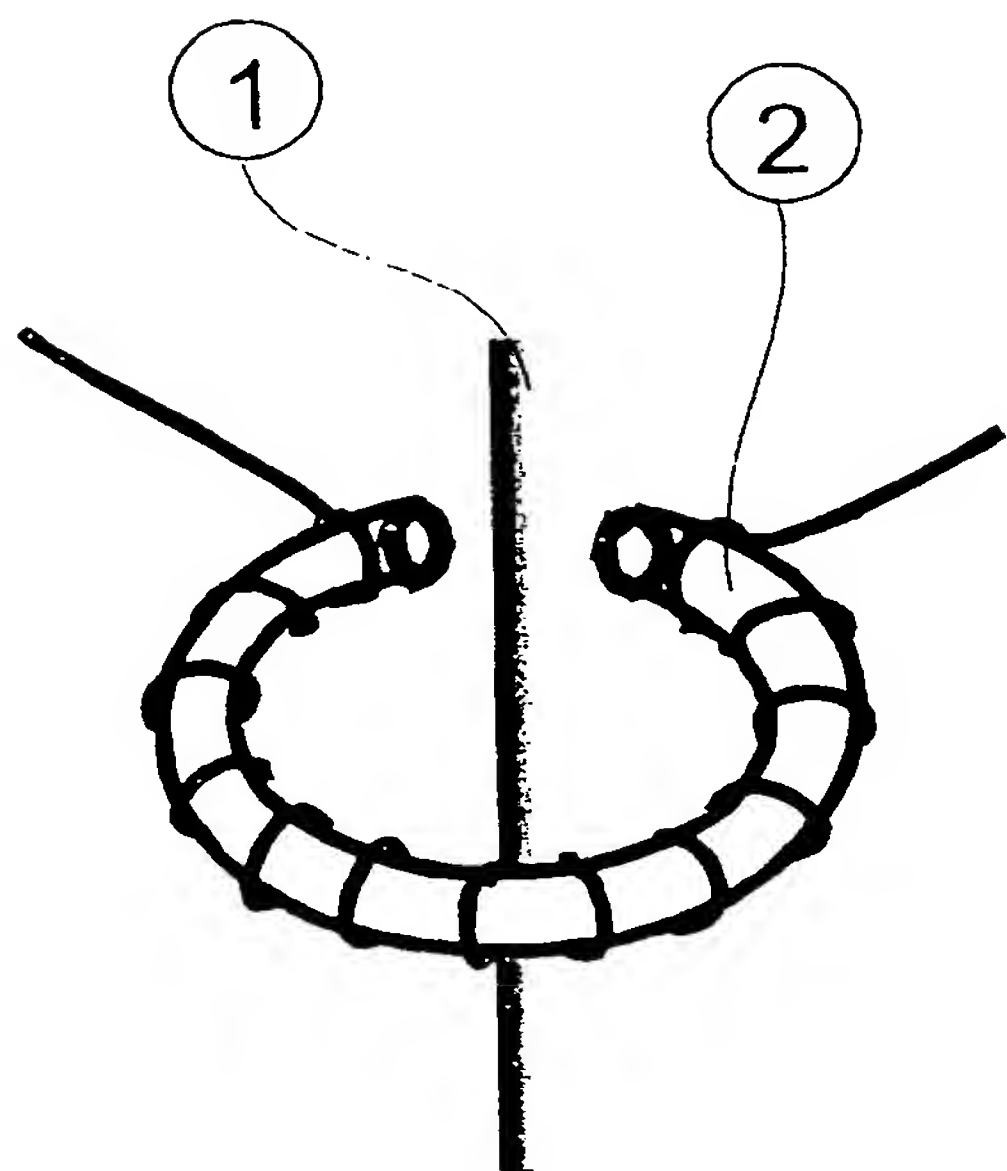


Fig. 2

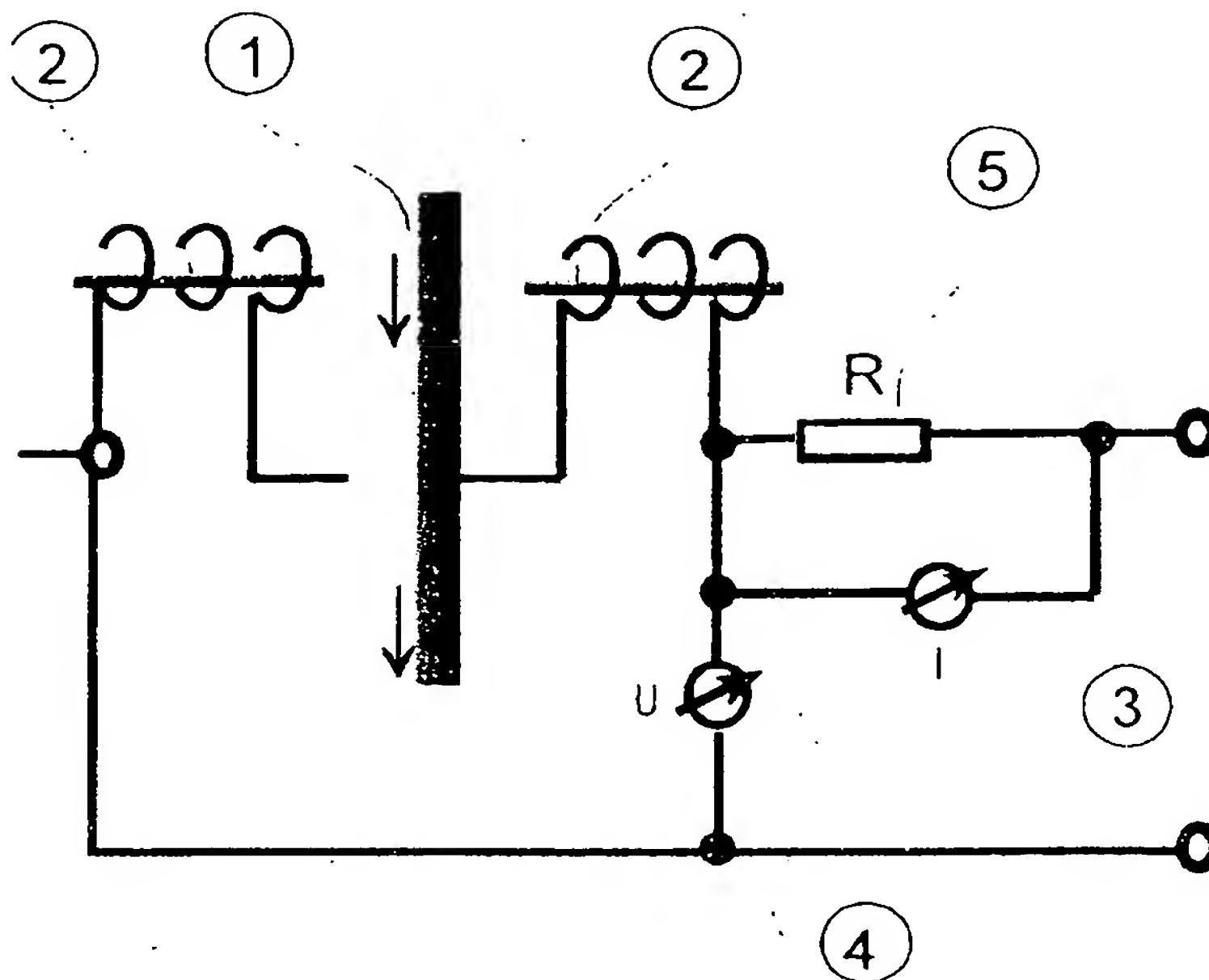


Fig. 3

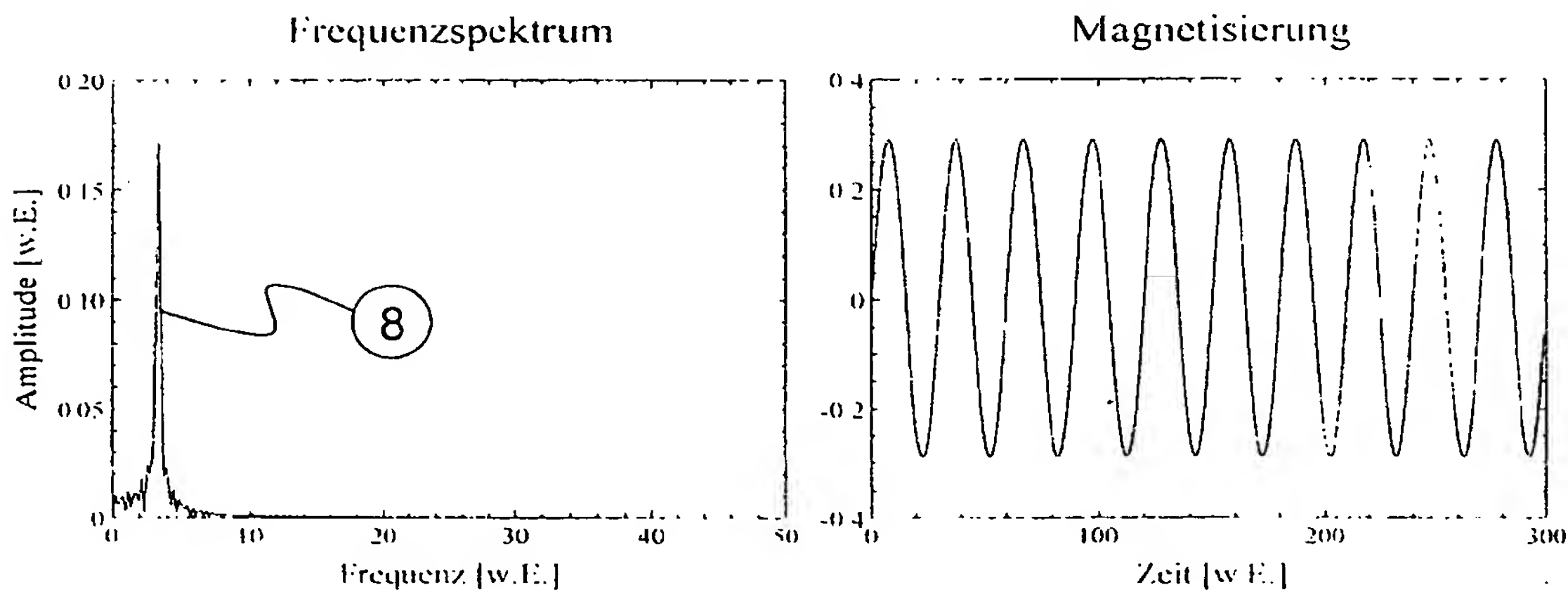


Fig. 4

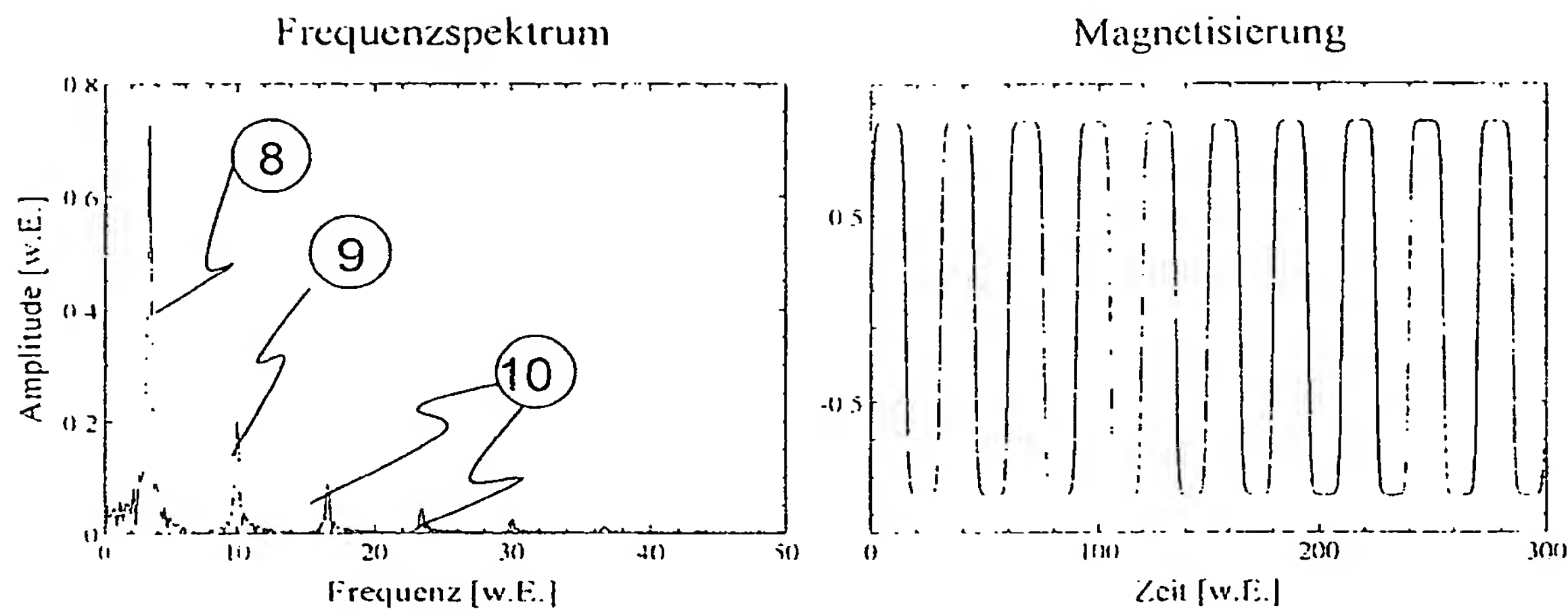


Fig. 5